沃尔巴克氏体感染对黑腹果蝇性腺和早期胚胎 DNA 6mA 去甲基化酶基因 *DMAD* 表达的影响

张 维, 郑 雅, 王玉凤*

(华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079)

摘要:【目的】DNA 甲基化是基因修饰的一种重要方式,主要可以形成 5-甲基胞嘧啶(5mC)和 6-甲基腺嘌呤(6mA)等。目前关于 5mC 的研究比较多,而关于 6mA 在真核生物中的研究则较少。沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是昆虫中最常见的共生菌之一,可通过多种方式操纵宿主生殖,其中最常见的就是引起精卵细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI),即感染 *Wolbachia* 的雄性与未感染的雌性宿主交配后,胚胎致死,但其机制还不清楚。本研究拟从 6mA 甲基化的角度,探讨 *Wolbachia* 影响果蝇生殖的分子机制。【方法】以模式生物黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 为材料,通过实时荧光定量 PCR 方法,检测 *Wolbachia* 感染对果蝇精巢、卵巢以及 3 个交配组〔TT(对照,父母本都未感染), TW(父本未感染,母本感染,胚胎感染,可发育)和 WT(CI, 致死)〕早期胚胎中 DNA 6mA 去甲基化酶基因 *DMAD* 的表达变化。【结果】*Wolbachia* 感染可显著上调 1 日龄果蝇精巢中 *DMAD* 的表达水平,而对卵巢中 *DMAD* 的表达没有显著影响。在产卵后 0.5 h(中囊胚过渡前)的胚胎中,CI 胚胎的 *DMAD* 表达水平极显著高于可正常发育的胚胎(TT 和 TW);在 3 h 的胚胎(中囊胚过渡期)中,TW 和 CI 胚胎中 *DMAD* 的表达量都极显著高于对照组;在 6 h 的胚胎(中囊胚过渡后)中,CI 胚胎中 *DMAD* 的表达量相对最低。【结论】*Wolbachia* 感染可能通过干扰宿主果蝇精巢中 6mA 甲基化水平对精子产生修饰,导致其与正常未感染的卵子受精后胚胎致死。

关键词: 黑腹果蝇; 沃尔巴克氏体; 6mA 甲基化; *DMAD*; 精巢; 卵巢; 胚胎

中图分类号: Q964 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)11-1292-08

Effects of *Wolbachia* infection on the expression of DNA 6mA demethylase gene *DMAD* in gonads and early embryos of *Drosophila melanogaster*

ZHANG Wei, ZHENG Ya, WANG Yu-Feng* (School of Life Sciences, Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract:【Aim】DNA methylation is one of the important ways of gene modification, mainly resulting in 5mC and 6mA. At present, there have been many studies related to 5mC, while studies on 6mA in eukaryotes are rare. *Wolbachia* bacteria are endosymbionts frequently found in insects. They can mediate their hosts' reproduction *via* several strategies. Cytoplasmic incompatibility (CI) is the most common defect induced by *Wolbachia*, which arrests the development of embryos from uninfected females that are mated with *Wolbachia*-infected males. The molecular mechanisms of CI, however, are not clear. The aim of this study is to investigate the mechanisms of *Wolbachia* affecting the reproduction of *Drosophila* from the viewpoint of 6mA methylation.【Methods】The model organism *D. melanogaster* was used as the test insect. Quantitative RT-PCR was adopted to detect the expression levels of DNA 6mA demethylase gene

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672352)

作者简介: 张维, 女, 1994 年生, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫发育生物学, E-mail: 984684467@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yfengw@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-07-08; 接受日期 Accepted: 2017-09-30

(*DMAD*) in testes, ovaries and early embryos of *Wolbachia*-infected and uninfected *D. melanogaster* flies. The embryos examined were from three different crosses: TT (the control, with both males and females uninfected), TW (viable, males were uninfected while females were *Wolbachia*-infected), and WT (lethal CI embryos, with males *Wolbachia*-infected and females uninfected).【Results】*Wolbachia* infection significantly up-regulated the expression of *DMAD* in testes of 1-day-old flies, but had no effects on *DMAD* expression in ovaries. In early CI embryos (0.5 h, pre-midblastula transition), *DMAD* expressionin level was significantly higher than those of the control and TW embryos. In the embryos at midblastula transition (3 h), the transcriptional levels of *DMAD* in TW and CI were extremely higher than that in the control embryos. In 6 h embryos (post-midblastula transition), however, *DMAD* expressionin level was the lowest in CI embryos as compared with the control and TW embryos.【Conclusion】*Wolbachia* infection may significantly change 6mA level in testes of their *Drosophila* hosts, and thus result in death of early embryos derived from *Wolbachia*-infected males and uninfected females.

Key words: *Drosophila melanogaster*; *Wolbachia*; 6mA modification; *DMAD*; testis; ovary; embryo

DNA 甲基化是生物体中一种重要的基因修饰方式,是表观遗传学的重点研究内容之一。DNA 甲基化修饰可参与调控基因的表达和可变剪切,与生物体的生长、发育、生殖等重要的生物学功能密切相关(Lloyd, 2000; Jones and Baylin, 2002; Iyer *et al*., 2016)。DNA 甲基化在生物体内主要形成 5-甲基胞嘧啶(5mC)和 6-甲基腺嘌呤(6mA)。目前,研究者们对于甲基化的研究取得了重要进展,然而这些研究主要集中于细菌、植物和高等动物等中,对于无脊椎动物如昆虫中的甲基化的研究较少(Glastad *et al*., 2016)。最初,人们认为黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 是一种缺乏 DNA 甲基化的模式生物(Urieli-Shoval *et al*., 1982)。然而,随后的研究发现,在果蝇 *Drosophila* 中也存在 DNA 甲基化修饰系统,并检测到 2 个与 5mC 形成相关的基因,分别是甲基转移酶基因(*dDnmt2*)和甲基结合蛋白基因(*dMBD2/3*)(Hung *et al*., 1999; Tweedie *et al*., 1999; 郭欣欣等, 2011),其中 dDNMT2 被认为是果蝇中唯一的 DNA 甲基转移酶。

近年来,研究者发现 6mA 在原核生物以及一些低等的真核生物中丰度很高,但在高等真核生物基因组中的含量极低,这使得对高等真核生物的 6mA 研究更加困难(Luo *et al*., 2015)。黑腹果蝇中 6mA 的含量大约只有 0.001% ~0.07%,并且在胚胎发育过程中处于动态变化状态。早期胚胎中,6mA 水平较高,在 0.75 h 左右达到最高,之后迅速下降。此外,6mA 在果蝇成体组织如脑和卵巢中也较低,与晚期胚胎表达水平相当(Zhang *et al*., 2015)。研究者还发现,果蝇的细胞核提取物具有 DNA 6mA 去甲基化活性,其与 6mA 甲基化水平密切相关。这种物质被鉴定为 5mC 去甲基化酶 Tet50 的同源物,因此将其命名为 DNA 6mA 去甲基化酶(DNA 6mA demethylase, DMAD)(Zhang *et al*., 2015)。DMAD 的发现为真核生物 DNA 甲基化修饰途径的研究带来了新的方向。

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一种广泛存在于昆虫体内的胞内共生菌,可以通过多种方式来调节宿主的生殖(熊恩娟等, 2014; 陶云荔等, 2015; 李培光等, 2015; 陈茜等, 2016),其中最常见的方式就是诱导昆虫宿主产生精卵细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI),即感染 *Wolbachia* 的雄性与未感染或感染不同品系 *Wolbachia* 的雌性宿主交配后,胚胎不能正常发育,于早期死亡。而感染同种 *Wolbachia* 的雌雄宿主交配后,却能正常产生后代(张艳凯等, 2015; Beckmann *et al*., 2017)。目前,关于 CI 的分子机制仍处于探索中。已有研究表明,产生 CI 的原因可能是 *Wolbachia* 对宿主的精核进行了"修饰",从而使父本染色体产生一系列的改变。当修饰后的精子进入到含有同种 *Wolbachia* 的卵子中时,卵中的同种 *Wolbachia* 能够挽救被"修饰"了的精核,从而使得配子之间可以相互融合产生后代。如果被 *Wolbachia*"修饰"过的精子进入到未感染的卵子中,由于卵子中没有 *Wolbachia*,因此不能进行挽救,导致胚胎发育停滞,因而无法正常产生后代(Clark *et al*., 2003; Serbus *et al*., 2008; Yuan *et al*., 2015)。

由于 DNA 甲基化是一种重要的修饰途径,且在精子发生、受精后精核解凝及染色质重组、早期胚胎发育等过程中有重要作用,因此本研究采用定量 RT-PCR (qRT-PCR)技术探究 *Wolbachia* 感染对果

蝇性腺及早期胚胎 *DMAD* 基因的表达的影响，旨在为进一步探索 *Wolbachia* 诱导昆虫宿主产生 CI 的分子机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 试虫来源

感染 *w*Mel *Wolbachia* 的黑腹果蝇 *D. melanogaster*（Dmel *w*Mel）来自澳大利亚莫纳什大学（Monash University）Scott L. O′Neill 教授实验室，在本实验室传代保存。去除 *Wolbachia* 的黑腹果蝇作为对照，记为 Dmel T。果蝇体内的 *Wolbachia* 用四环素处理去除（Hoffmann *et al*., 1986），用 PCR 方法检测 *Wolbachia* 去除与否（Zheng *et al*., 2011b）。将去除了 *Wolbachia* 后的果蝇再用普通培养基喂养 6 代以上，以消除四环素处理对果蝇其他方面的影响（Chrostek *et al*., 2013）。所有果蝇都用玉米粉-红糖培养基于 25℃恒温培养箱培养。

1.2 试虫材料收集

由于 *Wolbachia* 引起的 CI 强度会随着雄性日龄的增加而迅速下降，1 日龄雄蝇引起的 CI 强度最强（Zheng *et al*., 2011a），而 3 日龄的雌蝇卵巢发育完全成熟，处于产卵高峰期，因此为研究 *Wolbachia* 感染对雄、雌果蝇生殖的影响及与 CI 的关系，分别收集约 50 头 Dmel *w*Mel 和 Dmel T 的 1 日龄雄蝇和 3 日龄雌蝇，解剖出精巢和卵巢，用于后续的基因表达检测实验。

收集 3 种不同类型的胚胎：（1）来自 Dmel T（♂）× Dmel T（♀）交配组，简称 TT，未感染 *Wolbachia*，可正常发育，作为对照组；（2）来自 Dmel T（♂）× Dmel *w*Mel（♀）交配组，简称 TW，感染 *Wolbachia* 的胚胎，可正常发育；（3）来自 Dmel *w*Mel（♂）× Dmel T（♀）交配组，简称 WT，为 CI 胚胎，未感染 *Wolbachia*，不能正常发育。分别收集各交配组产下的 0.5 h（中囊胚过渡前）、3 h（中囊胚过渡期）、6 h（中囊胚过渡后）的胚胎，检测胚胎中 *DMAD* 的表达量。

胚胎收集方法具体如下：（1）分别收取 3 日龄处女蝇和 1 日龄雄蝇，分别将 3 个交配组 TW，WT 和 TT 按照设计的模式将雌雄果蝇放在一起进行交配适应，每个交配组放雌蝇约 200 头，雄蝇约 250 头，以保障交配行为的发生；（2）交配一夜后，将果蝇转移到葡萄汁收集盘中，适应 1 h 左右；（3）换新的收集盘，开始计时。0.5 h 胚胎：从新收集盘放入培养箱收卵时开始计时，0.5 h 后收取胚胎；3 h 胚胎：产卵 0.5 h 后取出收集盘，将收集盘放置培养箱中待胚胎发育 3 h 后收集胚胎；6 h 胚胎：产卵 0.5 h 后取出收集盘，将收集盘放置培养箱中待胚胎发育 6 h 后收集胚胎。

1.3 RNA 的提取及 RT-PCR 检测

用 Trizol RNA 提取试剂盒（invitrogen 公司）提取 Dmel T 和 Dmel *w*Mel 果蝇的 1 日龄雄蝇和 3 日龄雌蝇的精巢、卵巢以及不同交配组胚胎的总 RNA。在测定 RNA 浓度后，取 1 μg 总 RNA 样品，用 Oligo（dT）$_{18}$引物（TaKaRa）及逆转录酶 M-MLV（Invitrogen 公司）合成 cDNA 第 1 链。通过半定量 RT-PCR 检测模板 cDNA 的质量。

1.4 基因表达的实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测

本实验所用引物的序列采用 Primer Premier 5 软件设计，由北京擎科新业生物技术有限公司合成。引物序列：*DMAD*-F（5'-AGCCCGATGAAATCCCTGAG-3'）；*DMAD*-R（5'-AGACGAAGCCGTGCCCAAAT-3'）。*rp*49（内参）-F（5'-CGGTTACGGATCGAACAAGC-3'）；*rp*49-R（5'-CTTGCGCTTCTTGGAGGAGA-3'）。

选用 SYBR Green II Dye，用 BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR。反应体系：SYBR PremixEx Taq10 μL，cDNA 模板 1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.3 μL，加 ddH$_2$O 补至 20 μL。反应条件：95℃预热 30 s；再经过 40 个循环，每个循环过程为 95℃ 10 s，62℃ 30 s，72℃ 20 s。最后溶解曲线从 55℃到 98℃每 0.2℃读 1 s，同时进行 ROX 值校正。反应结束后，读取 Ct 值。利用荧光曲线值和 Ct 值就可以计算 *DMAD* 基因的相对表达量，以 *rp*49 基因为内参（Zheng *et al*., 2011b；LePage *et al*., 2014）。基因相对表达量为 $2^{-\Delta Ct}$，每种样品至少做 3 个生物学重复。

1.5 数据处理

数据以平均值 ± 标准误（mean ± *SE*）表示。数据分析采用 SPSS14.0 统计分析软件完成，用 GraphPad Prism 软件作图，用 *t*-检验比较基因相对表达量之间的差异显著性，$P < 0.05$为差异显著，$P < 0.01$为差异极显著。

2 结果

2.1 *Wolbachia* 感染对果蝇性腺中 *DMAD* 表达的影响

为了探究 *Wolbachia* 感染是否影响果蝇性腺中

的 6mA 甲基化水平，从而影响了基因的表达，我们首先采用 qRT-PCR 技术检测了 *Wolbachia* 感染和未感染果蝇精巢和卵巢中 *DMAD* 的表达差异。结果发现，在未感染 *Wolbachia* 的果蝇中，精巢 *DMAD* 基因的表达水平显著高于卵巢（$P < 0.05$），在 *Wolbachia* 感染的果蝇中，精巢 *DMAD* 基因的表达水平则极显著高于卵巢（$P < 0.01$）。*Wolbachia* 感染对卵巢中 *DMAD* 的表达水平没有显著影响，然而，在 *Wolbachia* 感染的果蝇精巢中，*DMAD* 基因的表达量极显著高于未感染的果蝇精巢（$P < 0.01$）（图 1）。这一结果表明，*Wolbachia* 感染能够显著上调果蝇精巢中 *DMAD* 的表达。

2.2　不同交配组胚胎发育过程中 *DMAD* 表达的动态变化

由于 *Wolbachia* 感染引起昆虫宿主产生的最普遍的表型就是 CI，为了研究 CI 胚胎致死的原因，我们研究了不同交配组胚胎不同发育时期 *DMAD* 的表达量的动态变化，结果如图 2 所示。在对照组胚胎（TT）中，*DMAD* 的表达量在发育早期（0.5 h，3 h）都比较低，而在 6 h（中囊胚过渡后）则极显著上调（$P < 0.01$）（图 2：A）；在 TW 胚胎（感染 *Wolbachia* 的胚胎，能正常发育）中，*DMAD* 的表达量在发育早期（0.5 h，中囊胚过渡前）也比较低，但在胚胎发育至 3 h（中囊胚过渡期）则极显著上调，在中囊胚过渡后略有下降，但也极显著高于 0.5 h 胚胎（图 2：B）；而在 WT（CI 胚胎，大部分致死）中，*DMAD* 的表达水平在 0.5 h 较低，在胚胎发育至 3 h（中囊胚过渡期）略有升高，与 0.5 h 胚胎没有显著差异，但在中囊胚过渡后（6 h）则极显著上调（图 2：C）。

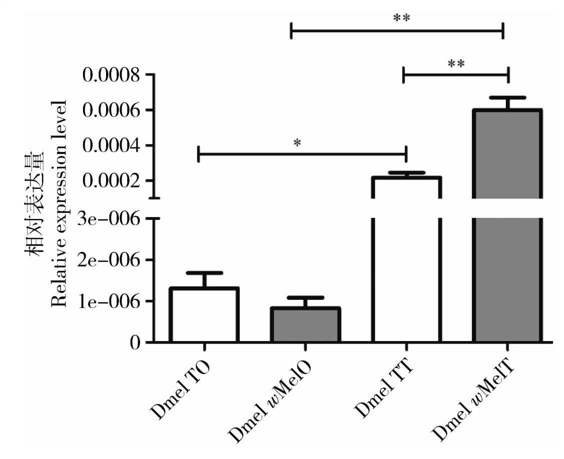


图 1　*Wolbachia* 感染对黑腹果蝇性腺 *DMAD* 表达量的影响

Fig. 1　Effect of *Wolbachia* infection on *DMAD* expression in the gonads of *Drosophila melanogaster*

Dmel TO：未感染果蝇卵巢 Ovaries from uninfected *D. melanogaster*；Dmel *w*MelO：感染 *w*Mel *Wolbachia* 的果蝇卵巢 Ovaries from *D. melanogaster* infected with *w*Mel *Wolbachia*；Dmel TT：未感染果蝇精巢 Testes from uninfected *D. melanogaster*；Dmel *w*MelT：感染 *w*Mel *Wolbachia* 的果蝇精巢 Testes from *D. melanogaster* infected with *w*Mel *Wolbachia*. * $P < 0.05$；** $P < 0.01$（*t*-检验 *t*-test）.

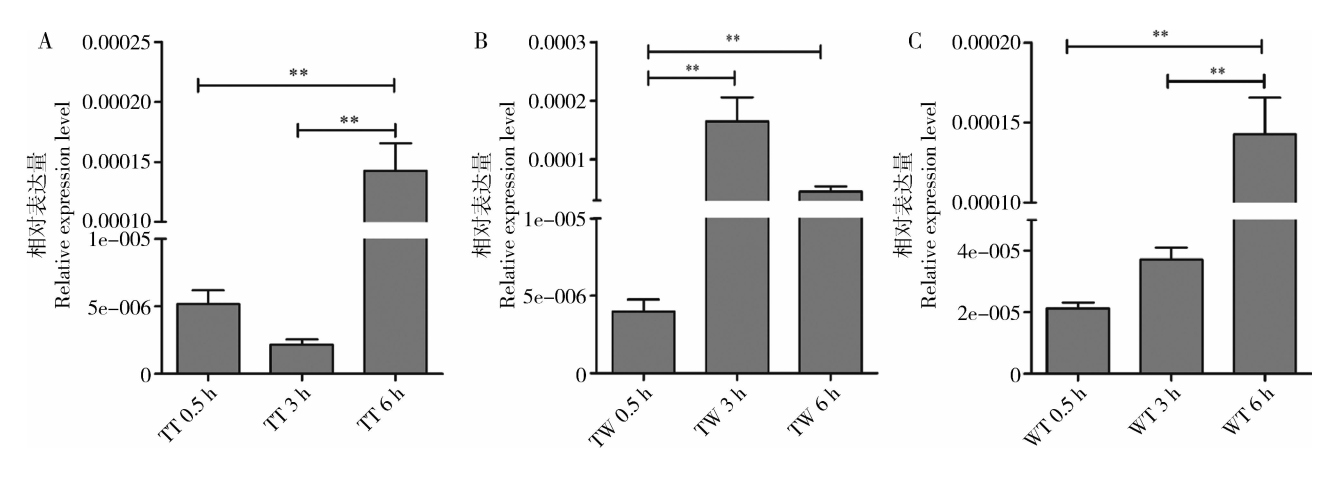


图 2　黑腹果蝇各交配组胚胎不同发育阶段 *DMAD* 表达水平的动态变化

Fig. 2　The dynamics of *DMAD* expression in different developmental stages of embryos derived from each of three cross types of *Drosophila melanogaster*

TT：来自 Dmel T（♂）× Dmel T（♀）交配组的胚胎 Embryos from Dmel T（♂）× Dmel T（♀）cross group；TW：来自 Dmel T（♂）× Dmel *w*Mel（♀）交配组的胚胎 Embryos from Dmel T（♂）× Dmel *w*Mel（♀）cross group；WT：来自 Dmel *w*Mel（♂）× Dmel T（♀）交配组的 CI 胚胎 CI embryos from Dmel *w*Mel（♂）× Dmel T（♀）cross group. * $P < 0.05$；** $P < 0.01$（*t*-检验 *t*-test）.

2.3 不同交配组胚胎相同发育期 *DMAD* 的表达差异

为进一步研究 CI 胚胎和正常发育胚胎的差异，我们又比较了不同交配组胚胎相同发育期 *DMAD* 的表达水平，结果如图 3 所示。在 0.5 h 的胚胎中，TT 对照组和携带 *Wolbachia* 且能正常发育的 TW 胚胎中，*DMAD* 表达水平都较低，而在 WT 交配组的 CI 胚胎中，*DMAD* 的表达量极显著高于 TT 和 TW 胚胎（图 3：A，$P<0.01$）；在 3 h 的胚胎中，TT 的 *DMAD* 表达水平仍然较低，而 TW 和 WT 中 *DMAD* 的表达量都极显著高于 TT 组（图 3：B，$P<0.01$）；然而，当胚胎发育 6 h 后，*DMAD* 在 TT 对照组中表达量较高，而在 TW 和 WT 胚胎中的表达量均显著低于对照组胚胎（图 3：C，$P<0.01$），且 WT 组的 CI 胚胎中 *DMAD* 表达量最低（$P<0.01$）。这些结果表明，在果蝇胚胎发育早期的不同阶段，*DMAD* 在不同类型胚胎中的表达量出现显著差异。

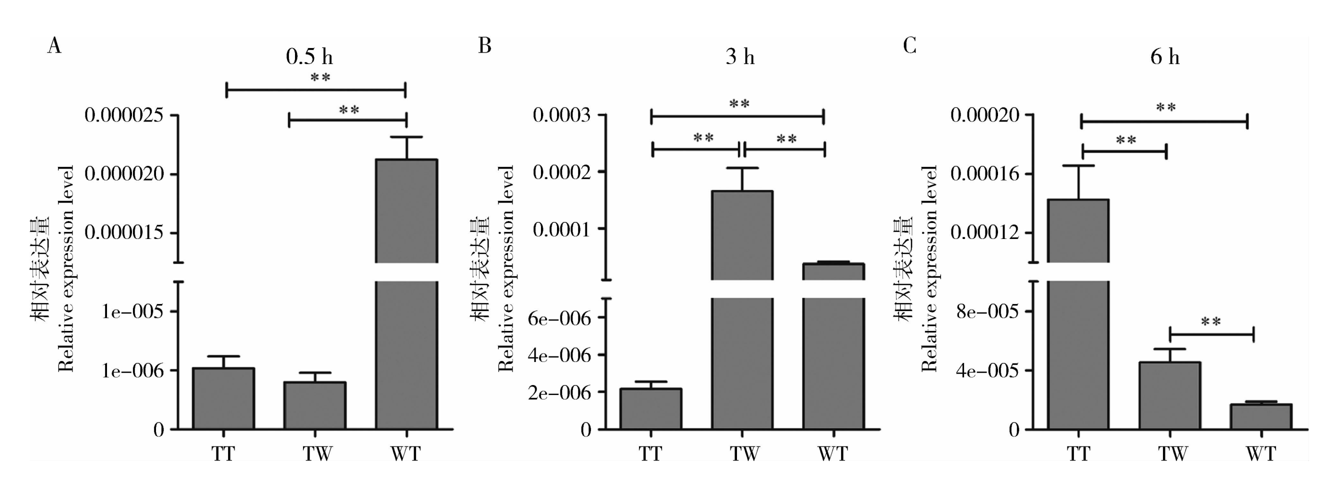


图 3 黑腹果蝇各交配组相同发育期胚胎中 *DMAD* 的表达水平比较

Fig. 3 Comparison of *DMAD* expression in the same developmental stage of embryos derived from different cross types of *Drosophila melanogaster*

A：0.5 h 胚胎中 *DMAD* 的相对表达水平 Relative expression levels of *DMAD* in embryos at 0.5 h；B：3 h 胚胎中 *DMAD* 的相对表达水平 Relative expression levels of *DMAD* in embryos at 3 h；C：6 h 胚胎中 *DMAD* 的相对表达水平 Relative expression levels of *DMAD* in embryos at 6 h. TT：来自 Dmel T（♂）× Dmel T（♀）交配组的胚胎 Embryos from Dmel T（♂）× Dmel T（♀）cross group；TW：来自 Dmel T（♂）× Dmel *w*Mel（♀）交配组的胚胎 Embryos from Dmel T（♂）× Dmel *w*Mel（♀）cross group；WT：来自 Dmel *w*Mel（♂）× Dmel T（♀）交配组的 CI 胚胎 CI embryos from Dmel *w*Mel（♂）× Dmel T（♀）cross group. $^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$（*t*-检验 *t*-test）.

3 讨论

以往的研究表明，高等真核生物基因组中的 6mA 含量极低，其甲基化方式主要是 5mC，而 6mA 只在原核生物以及一些低等真核生物中丰度较高（Greer *et al*., 2015）。在原核生物中，6mA 对基因组进行 DNA 修饰，以区分自身 DNA 和外来病原体 DNA，并且通过限制修饰系统（restriction-modification system）保护宿主基因组。在这个系统中，6mA 甲基化酶可以修饰宿主 DNA，并协助宿主自身基因组抵制自身限制性酶的消化，而外来 DNA 则会被宿主中的限制性酶识别并清除。除此之外，6mA 还参与细菌 DNA 的复制和修复、转座、基因调控等过程（Wion and Casadesús, 2006）。然而，近年来的研究发现，6mA 在真核生物乃至高等哺乳动物发育过程中都发挥重要作用（Greer *et al*., 2015；Zhang *et al*., 2015；Liu *et al*., 2016；Wu *et al*., 2016）。

由于内共生菌 *Wolbachia* 感染能够对昆虫宿主产生多方面影响，其中最普遍的现象是对精子产生修饰作用进而影响胚胎发育，即诱导产生 CI。已有研究表明，过量表达或敲除果蝇的 DNA 甲基化转移酶基因 *Dnmt2* 既没有诱导也没有增加 CI 的强度（LePage *et al*., 2014），似乎表明 *Wolbachia* 感染与宿主果蝇的基因甲基化及 CI 没有联系。然而，*Dnmt2* 仅与 5mC 甲基化相关。为了研究 *Wolbachia* 感染是否影响果蝇 6mA 甲基化从而导致精子发生异常而产生 CI，本研究首先检测了感染 *Wolbachia* 对果蝇性腺中 *DMAD* 表达的影响。结果显示，*Wolbachia* 感

染能够极显著上调果蝇精巢中 *DMAD* 的表达水平，而对卵巢中 *DMAD* 的表达水平无显著影响。这表明，*Wolbachia* 感染可能使得精巢中 DNA 的 6mA 甲基化发生了重要改变，导致宿主果蝇精巢中 DNA 的 6mA 甲基化水平下降。由于在果蝇中 6mA 的甲基化水平与基因表达呈正相关关系（Zhang *et al.*，2015；Luo *et al.*，2015），这一结果表明，*Wolbachia* 感染会导致宿主果蝇精巢基因表达下调，这与我们前期通过 microarray 和比较蛋白组学技术研究的结果（Zheng *et al.*，2011b；Yuan *et al.*，2015）一致，*Wolbachia* 感染导致宿主果蝇精巢中许多与雄性生殖（特别是精子发生）相关的基因表达下调，从而影响果蝇的精子发生，进而导致雄性育性缺陷。此外，本研究还发现，无论是在未感染还是在感染 *Wolbachia* 的果蝇中，精巢中 *DMAD* 的表达水平都显著高于卵巢，提示精巢中 6mA 甲基化水平显著低于卵巢，这与斑马鱼和猪中的研究结果相似，该研究发现，在斑马鱼和猪中，卵子中 6mA 的水平要比精子高数倍（Liu *et al.*，2016）。但这与斑马鱼卵母细胞中 5mC 甲基化水平低于精子（Jiang *et al.*，2013）相反，表明 DNA 的 5mC 甲基化和 6mA 甲基化在生殖细胞的发生和胚胎发育过程中具有不同的作用。然而，由于 5mC 甲基化水平与基因表达呈负相关关系，因此，这些结果都说明卵巢中基因表达要比精巢活跃，这可能因为卵子发生过程中需要储备大量的 RNA 和蛋白质供早期胚胎所用，而精子发生过程中精核逐渐浓缩以减小体积便于运动。

为了进一步研究 *Wolbachia* 诱导昆虫宿主产生 CI 是否与 6mA 甲基化相关，我们检测了同类胚胎不同发育时期 *DMAD* 表达水平的动态变化。结果显示，在对照组胚胎（TT）中，中囊胚过渡前和中囊胚过渡期的胚胎中 *DMAD* 表达量均比较低，而在中囊胚过渡后的胚胎（6 h）中 *DMAD* 表达量迅速增加。在可正常发育的 TW 胚胎中，*DMAD* 的表达水平在中囊胚过渡期就极显著升高。在不能正常发育的 CI（WT）胚胎中，随着发育的进行 *DMAD* 表达水平在产卵后 6 h 的胚胎中最高。在这 3 组胚胎中，随着胚胎发育的进行，*DMAD* 表达水平都逐渐增高，表明 6mA 的水平逐渐降低。对于对照组 TT 胚胎和 WT 组 CI 而言，都是在产卵后 6 h 的胚胎期，*DMAD* 表达水平最高，这与 Zhang 等（2015）的研究结果一致。而在 TW 组胚胎中，虽然 0.5 h 的胚胎中 *DMAD* 表达水平也较低，但在 3 h 的胚胎中 *DMAD* 表达水平就迅速达到最高，极显著高于 0.5 h 的胚胎。这表明，早期胚胎（产卵后 0 – 3 h）中 *DMAD* 表达水平可能与母本有关，因为 TT 和 WT 胚胎的母本都是未感染的 Dmel T，而 TW 胚胎的母本是感染 *Wolbachia* 的 Dmel *w*Mel。这也说明，TW 胚胎之所以能正常发育，可能是由于受精后胚胎中的 *DMAD* 表达水平迅速升高，即 6mA 水平迅速降低，使得胚胎中来自正常父本与带有 *Wolbachia* 母本的遗传物质发育速度在中囊胚过渡期得以协调，胚胎能够继续正常发育。而在 WT 组的 CI 胚胎中，早期胚胎（产卵后 0 – 3 h）中 *DMAD* 表达水平较低，说明 6mA 水平较高，基因表达较后期胚胎更活跃，胚胎中来自带 *Wolbachia* 的父本和来自正常母本的遗传物质发育速度无法协调，因而影响到胚胎发育的正常进行，进而导致发育停滞。已有研究发现，在 CI 胚胎中，来自带有 *Wolbachia* 的父本染色体发育速度较慢，与来自未感染 *Wolbachia* 的母本染色体发育速度不一致（Landmann *et al.*，2009），导致第一次核分裂时来自父本的染色体不能与母本染色体同步分离进入纺锤体两极，因此 CI 胚胎不能正常发育。

对相同发育期不同胚胎中 *DMAD* 的表达水平分析发现，在产卵后 0.5 h 的胚胎中，TT 对照组和可以正常发育的 TW 组 *DMAD* 表达水平都较低，这与 Zhang 等（2015）的研究结果一致，表明此时这两类胚胎中 6mA 水平较高，基因表达相对 CI 胚胎来说较为活跃。而 WT 交配组的 CI 胚胎中，*DMAD* 表达量极显著高于前二者，表明此时 CI 胚胎中 6mA 水平较低，基因表达相对前面两类胚胎不太活跃。而此时，胚胎中的核分裂应该正在快速进行，低水平的 6mA 可能导致 CI 胚胎核分裂异常，因而胚胎不能正常发育。

总之，本研究首次发现，*Wolbachia* 感染引起宿主果蝇精巢中 *DMAD* 基因表达极显著上调，表明 6mA 水平极显著下调。由于 6mA 可促进转座子的表达，6mA 水平下调可能引起转座子表达下降，从而影响到精子的正常功能，导致其与未感染 *Wolbachia* 的卵子受精后，胚胎不能正常发育，即产生 CI 表型。本研究组正在进行的 6mA 甲基化测序将为 *Wolbachia* 感染引起昆虫宿主产生 CI 的分子机制研究以及 *Wolbachia* 与宿主相互作用关系的深入研究提供新的线索。

参考文献（References）

Beckmann JF, Ronau JA, Hochstrasser M, 2017. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nat.*

Microbiol., 2: 17007.

Chen X, Wang LY, Yang ZQ, Zhao CJ, He L, Zhang HY, 2016. Temperature regulates the reproduction mode of *Trichogramma embryophagum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by influencing the titer of endosymbiont *Wolbachia*. *Acta Entomol. Sin*., 59(4): 464 -471. [陈茜, 王丽艳, 杨志强, 赵长江, 贺琳, 张海燕, 2016. 温度通过影响 *Wolbachia* 滴度调控赤眼蜂生殖方式. 昆虫学报, 59(4): 464 -471]

Chrostek E, Marialva MS, Esteves SS, Weinert LA, Martinez J, Jiggins FM, Teixeira L, 2013. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. *PLoS Genet*., 9(12): e1003896.

Clark ME, Veneti Z, Bourtzis K, Karr TL, 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mech. Dev*., 120: 185 -198.

Glastad KM, Gokhale K, Liebig J, Goodisman MA, 2016. The caste- and sex-specific DNA methylome of the termite *Zootermopsis nevadensis*. *Sci. Rep*., 6: 37110.

Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizábal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C, Shi Y, 2015. DNA methylation on N^6-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 161(4): 868 -878.

Guo XX, Ye HY, Zhang M, 2011. DNA methylation in *Drosophila*, a review of recent studies. *Hereditas*, 33(7): 713 -719. [郭欣欣, 叶海燕, 张敏, 2011. 果蝇 DNA 甲基化研究进展. 遗传, 33(7): 713 -719]

Hoffmann AA, Turelli M, Simmons GM, 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*, 40(4): 692 -701.

Hung MS, Karthikeyan N, Huang B, Koo HC, Kiger J, Shen CK, 1999. *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(21): 11940 -11945.

Iyer LM, Zhang D, Aravind L, 2016. Adenine methylation in eukaryotes: apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *BioEssays*, 38: 27 -40.

Jiang L, Zhang J, Wang JJ, Wang L, Zhang L, Li G, Yang XD, Ma X, Sun X, Cai J, Zhang J, Huang XX, Yu M, Wang XG, Liu F, Wu CI, He C, Zhang B, Ci WM, Liu J, 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 153: 773 -781.

Jones PA, Baylin SB, 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet*., 3: 415 -428.

Landmann F, Orsi GA, Loppin B, Sullivan W, 2009. *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS Pathog*., 5(3): e1000343.

LePage DP, Jernigan KK, Bordenstein SR, 2014. The relative importance of DNA methylation and Dnmt2-mediated epigenetic regulation on *Wolbachia* densities and cytoplasmic incompatibility. *PeerJ*, 2: e678.

Li PG, Qiu SQ, Ye BH, Wang NX, Huang DW, 2015. Influence of removing *Wolbachia* on the reproductive fitness and adult longevity of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Acta Entomol. Sin*., 58(9): 966 -972. [李培光, 邱仕祺, 叶保华, 王宁新, 黄大卫, 2015. 去除 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂繁殖适合度和成蜂寿命的影响. 昆虫学报, 58(9): 966 -972]

Liu J, Zhu Y, Luo GZ, Wang X, Yue Y, Wang X, Zong X, Chen K, Yin H, Fu Y, Han D, Wang Y, Chen D, He C, 2016. Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig. *Nat. Commun*., 7: 13052.

Lloyd V, 2000. Parental imprinting in *Drosophila*. *Genetica*, 109: 35 -44.

Luo GZ, Blanco MA, Greer EL, He C, Shi Y, 2015. DNA N^6-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 16(12): 705 -710.

Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W, 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia* host interactions. *Annu. Rev. Genet*., 42: 683 -707.

Tao YL, Guo YN, Wang J, Li LL, Yu Y, Chu D, 2015. Detection and identification of *Wolbachia* in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) populations from Shandong Province, China. *Acta Entomol. Sin*., 58(4): 454 -459. [陶云荔, 郭雅男, 王静, 李丽莉, 于毅, 褚栋, 2015. 山东不同地区韭菜迟眼蕈蚊共生菌 *Wolbachia* 的检测及鉴定. 昆虫学报, 58(4): 454 -459]

Tweedie S, Nghuck H, Barlow AL, Turner BM, Hendrich B, Bird A, 1999. Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet*., 23: 389 -390.

Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J, Razin A, 1982. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*., 146(1): 148 -152.

Wion D, Casadesús J, 2006. N^6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat. Rev. Microbiol*., 4: 183 -192.

Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, Liu Y, Byrum SD, Mackintosh SG, Zhong M, Tackett A, Wang G, Hon LS, Fang G, Swenberg JA, Xiao AZ, 2016. DNA methylation on N^6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 532(7599): 329 -333.

Xiong EJ, Zheng Y, Wang YF, Zeng QT, 2014. Phylogenetic analysis of *Wolbachia* in *Drosophila melanogaster* from three regions in China and their effects on host reproduction. *Acta Entomol. Sin*., 57(2): 176 -186. [熊恩娟, 郑雅, 王玉凤, 曾庆韬, 2014. 我国三地区黑腹果蝇中 *Wolbachia* 的系统发育关系及其对宿主生殖的影响. 昆虫学报, 57(2): 176 -186]

Yuan LL, Chen X, Zong Q, Zhao T, Wang JL, Zheng Y, Zhang M, Wang ZL, Brownlie JC, Yang, FQ, Wang YF, 2015. Quantitative proteomic analyses of molecular mechanisms associated with cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* induced by *Wolbachia*. *J. Proteome Res*., 14(9): 3835 -3847.

Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J, Li C, Liu B, Luo Y, Zhu Y, Zhang N, He S, He C, Wang H, Chen D, 2015. N^6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 161: 893 -906.

Zhang YK, Zhang KJ, Xie RR, Zhao DX, Hong XY, 2015. Research

Progress in cytoplasmic incompatibility induced by endosymbiont *Wolbachia*. *Acta Entomol. Sin.*, 58(12): 1344 – 1355. [张艳凯, 张开军, 谢蓉蓉, 赵冬晓, 洪晓月, 2015. 共生菌 *Wolbachia* 引起宿主细胞质不亲和的研究进展. 昆虫学报, 58(12): 1344 – 1355]

Zheng Y, Ren PP, Wang JL, Wang YF, 2011a. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility is associated with decreased *Hira* expression in male *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(4): e19512.

Zheng Y, Wang JL, Liu C, Wang CP, Walker T, Wang YF, 2011b. Differentially expressed profiles in the larval testes of *Wolbachia* infected and uninfected *Drosophila*. *BMC Genomics*, 12: 595.

(责任编辑: 马丽萍)